

LC-MS/MS 法测定动物源性食品中氢氯噻嗪等 10 种利尿剂的残留量

LCMSMS-626

摘要： 本文参考国家出入境检验检疫行业发布的行业标准《SN/T 5167-2019 出口动物源食品中氢氯噻嗪等 10 种利尿剂残留量的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》，使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 建立快速分析方法。该方法采用基质匹配曲线外标法定量，线性关系良好，相关系数均大于 0.9969；仪器检出限在 0.06~0.32 ng/mL 之间，完全满足标准中对检测灵敏度的要求；不同浓度标液重复测试，其保留时间和峰面积的相对标准偏差 RSD 值分别在 0.05%~0.17% 和 0.43%~4.12% 之间，仪器精密度良好；平均加标回收率在 64.82%~83.78% 之间，回收率良好。该方法灵敏可靠，可为相关行业人员参考使用。

关键词： 三重四极杆质谱联用仪 动物源食品 利尿剂 氢氯噻嗪

噻嗪类利尿剂是一类促进体液从组织中排出的西药，主要有氯噻嗪、氢氯噻嗪、螺内酯、丙磺舒和氯噻酮等 10 种化合物，在临床上作为口服利尿药和降压药广泛使用。滥用此类利尿剂可影响肾脏代谢，引起低血钾和缺钾、脂肪代谢紊乱、糖代谢改变、肌肉血流改变甚至肌肉坏死。在体育运动中，个别运动员会在参赛体质检查前服用利尿剂，通过快速排尿来快速减轻身体质量；或在兴奋剂检查前服用利尿剂，用以增加尿液和禁用药物代谢速度，使药物随尿液排出体外，从而逃避药物检测。因此，国家体育总局在《2021 年兴奋剂目录》中将利尿剂及其他具有相似化学结构的物质归属为禁用物质。由于运动员在日常饮食中需摄入肉类以提供足够的能量，若摄入的肉类中存在利

尿剂残留，也可能会导致尿检阳性，从而导致误检误判。因此，检测运动员膳食动物源性食品中利尿剂的残留量至关重要。

检测方法主要为高效液相色谱法、气相色谱 - 质谱法和液相色谱 - 质谱联用法。由于利尿剂类药物经动物吸收、代谢后，在肉组织等食品中的残留量很低，因此，需要有更高灵敏度和便捷性的检测方法。国家出入境检验检疫行业发布行业标准《SN/T 5167-2019 出口动物源食品中氢氯噻嗪等 10 种利尿剂残留量的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》。

本文参考 SN/T 5167-2019 该行业标准，使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 建立分析方法，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera-XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-40A

自动进样器：SIL-40C XR

输液泵：LC-40D XR × 2

质谱仪：LCMS-8050

柱温箱：CTO-40C

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

在线脱气机：DGU-405

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ (100 mm×2.1mm I.D., 1.9 μm)

P/N: 227-30807-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流动相：A 相 - 水；B 相 -0.01% 乙酸甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	60
3.50	Pumps	Pump B Conc.	75
6.00	Pumps	Pump B Conc.	85
6.05	Pumps	Pump B Conc.	95
8.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.05	Pumps	Pump B Conc.	10
11.00	Controller	Stop	

质谱条件：

离子源：ESI (±)

DL 温度：280°C

雾化气流速：3.0 L/min

加热模块温度：480°C

加热气流速：10.0 L/min

接口温度：380°C

干燥气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

表 2 MRM 参数

化合物名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
氨苯喋啶	396-01-0	254.10	237.10*	-10	-16	-17
			168.10	-13	-22	-18
丙磺舒	57-66-9	286.05	202.00*	-14	-15	-14
			121.10	-15	-26	-13
螺内酯	52-01-7	341.15	187.10*	-13	-21	-20
			107.10	-10	-30	-22
坎利酮	976-71-6	341.15	187.10*	-10	-22	-13
			107.10	-10	-30	-22
精磺胺	121-30-2	283.95	205.10*	13	20	21
			169.10	19	22	16
氯噻嗪	58-94-6	293.95	214.00*	20	18	24
			179.10	14	43	17
氢氯噻嗪	58-93-5	295.95	268.90*	14	18	29
			205.10	14	22	21
乙酰唑胺	59-66-5	221.05	83.10*	15	17	30
			58.00	15	14	21
氯噻酮	77-36-1	337.00	146.00*	12	18	28
			190.00	12	16	19
呋塞米	54-31-9	329.00	285.00*	11	13	13
			205.10	11	21	12

* 表示定量离子

■ 样品前处理及标准工作溶液的配制

2.1 样品前处理

2.1.1 样品提取

称取约 2 g 试样（精确至 0.01 g）置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙腈和 2 g 磷酸二氢钾，振荡提取 30 min，于 0°C 以 9000 r/min 转速离心 5 min，取上清液，再加入 10 mL 乙腈重复提取 1 次，离心后合并上清液于 50 mL 离心管中，待净化。

2.1.2 净化

在待净化上清液中加入 150 mg 无水硫酸镁、50 mg PSA、50 mg C18、7.5 mg GCB，涡旋混合 30 s，于 0°C 以 9000 r/min 离心 5 min，取全部上清液，于 45°C 下氮吹至近干，准确加入 2.0 mL 30% 甲醇水溶液（含 0.01% 乙酸）溶解，过 0.22 μm 微孔滤膜，待测定。

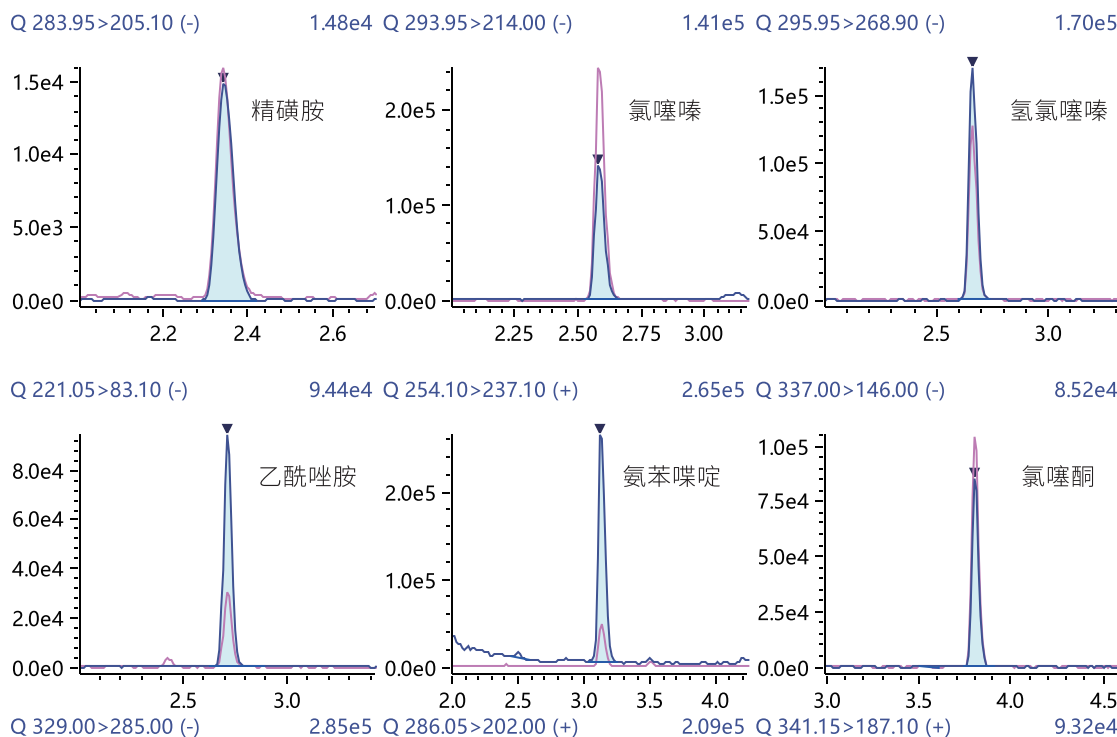
2.2 标准溶液的配制

标准储备溶液的配制：精密称取以上 10 种利尿剂固体标准品，甲醇溶解，获得 1.0 mg/mL 各储备溶液。

基质匹配校准工作溶液的配制：首先分别将各标准储备溶液混合，制得 100 mg/L 利尿剂混合溶液，再使用 30% 甲醇溶液（含 0.01% 乙酸）将该混合溶液稀释，制得浓度分别为 20、40、100、200、400、1000、2000 和 4000 ng/mL 纯标溶液，以待使用。取某空白样品，按照 2.1 法处理样品，制得空白基质溶液。分别取以上各纯标溶液，使用该空白基质溶液对应稀释，分别获得浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100 和 200 ng/mL 基质匹配的利尿剂标准工作溶液。

■ 结果与讨论

3.1 基质匹配校准溶液色谱图



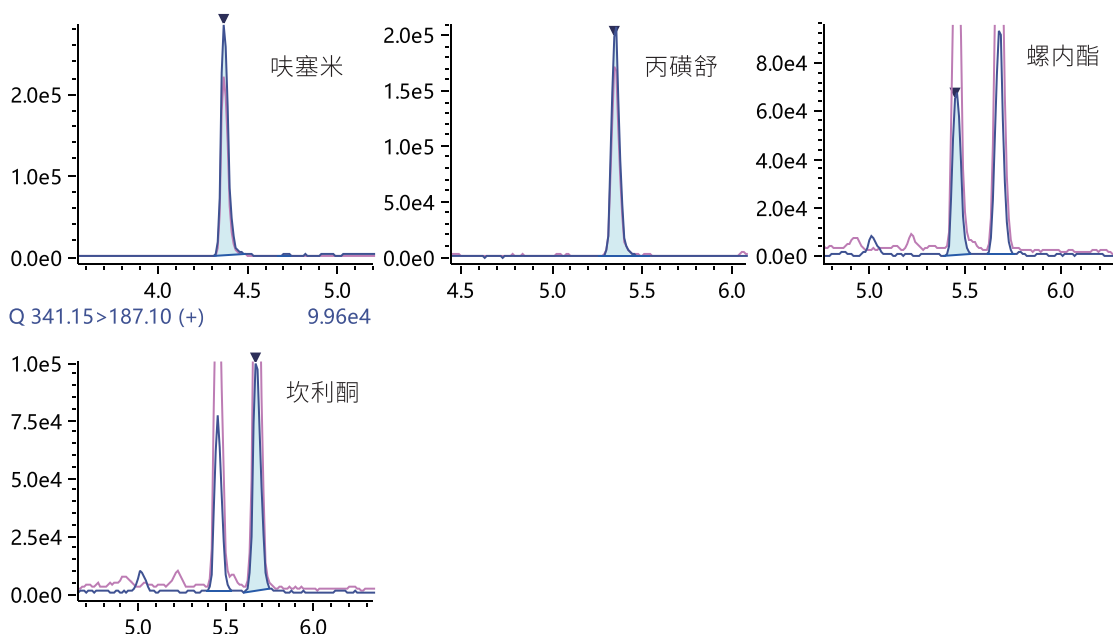
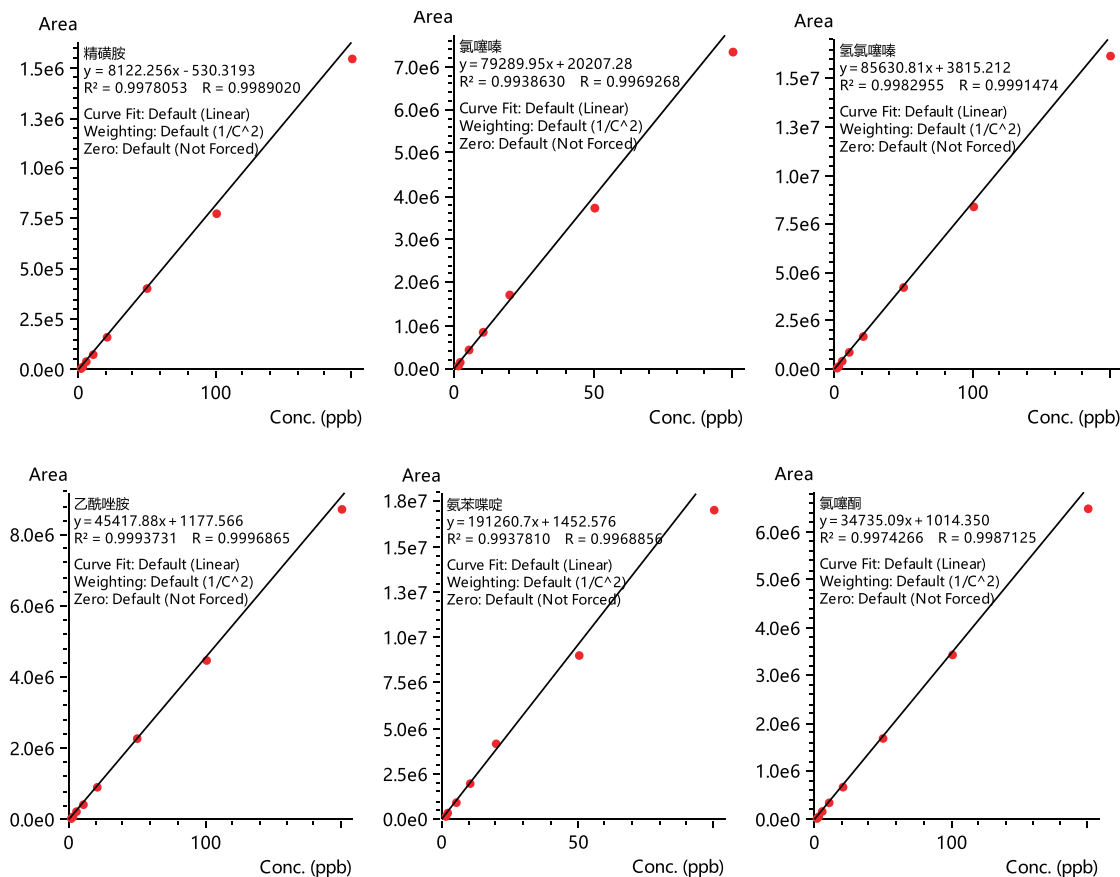


图 1 基质匹配校准溶液色谱图 (5 ng/mL)

3.2 校准曲线

将上述浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100 和 200 ng/mL 基质匹配标准工作溶液，按 1.2 分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，如图 2 所示；所得校准曲线线性关系良好，相关系数均大于 0.9969，线性回读精确度在 90.4~108.0% 之间，仪器检出限 (ASTM 法) 在 0.06~0.32 ng/mL 之间，满足 SN/T 5167-2019 中规定的灵敏度要求。



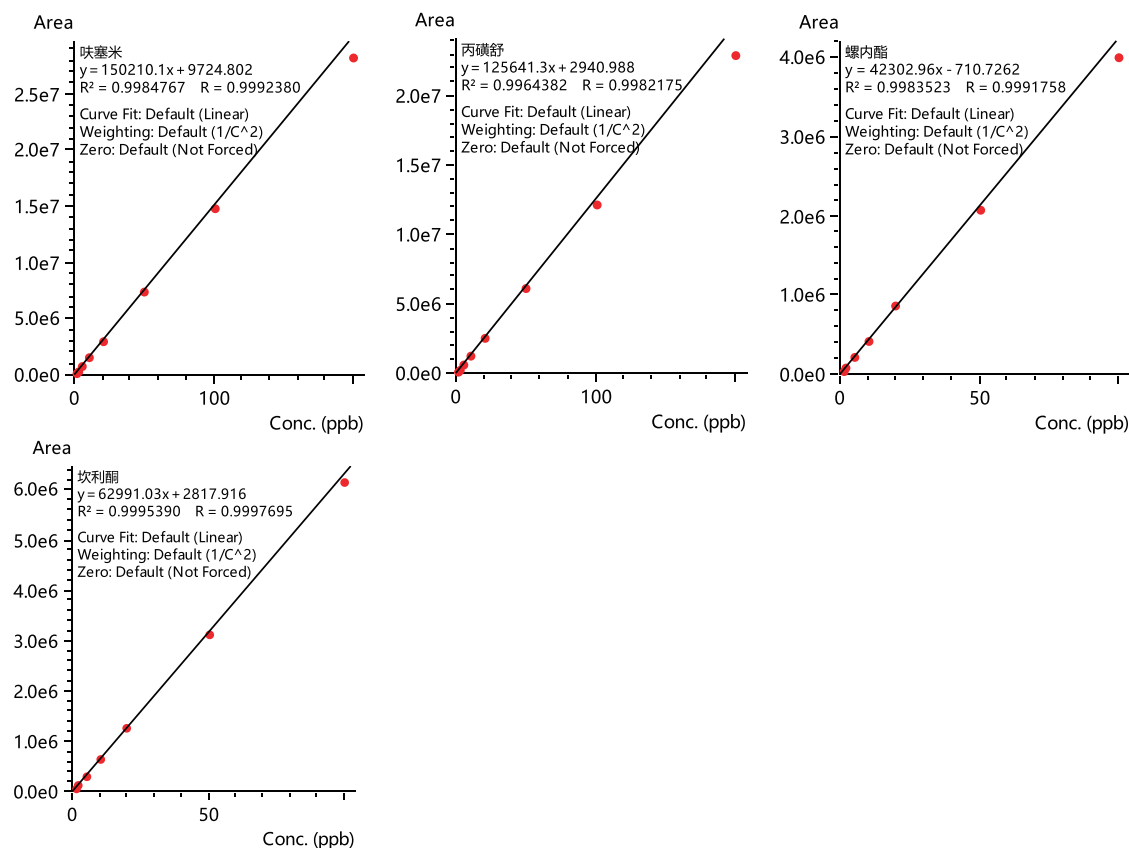


图2 利尿剂基质匹配校准曲线

 表3 10种利尿剂线性关系 (权重 $1/c^2$)

序号	化合物名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度 %	检出限 (ng/mL)
1	氨苯喋啶	$Y = (191261)X + (1452.58)$	1~100	0.9969	90.4~105.3	0.32
2	丙磺舒	$Y = (125641)X + (2940.99)$	1~200	0.9982	91.3~105.8	0.06
3	螺内酯	$Y = (42303.0)X + (-710.726)$	1~100	0.9991	94.7~104.3	0.30
4	坎利酮	$Y = (62991.0)X + (2817.92)$	1~100	0.9998	97.7~103.7	0.31
5	精磺胺	$Y = (8122.26)X + (-530.319)$	1~200	0.9989	95.4~106.7	0.21
6	氯噻嗪	$Y = (79289.9)X + (20207.3)$	1~100	0.9969	92.6~108.0	0.10
7	氢氯噻嗪	$Y = (85630.8)X + (3815.21)$	1~200	0.9991	94.7~105.7	0.06
8	乙酰唑胺	$Y = (45417.9)X + (1177.57)$	1~200	0.9997	96.1~102.8	0.14
9	氯噻酮	$Y = (34735.1)X + (1014.35)$	1~200	0.9987	93.7~106.5	0.10
10	呋塞米	$Y = (150210)X + (9724.80)$	1~200	0.9992	94.1~105.4	0.10

3.3 精密度

对不同浓度标准工作液连续测定6次,考察仪器精密度,保留时间和峰面积的重复性结果如表4所示。结果显示不同浓度下,各化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.05%~0.17%和0.43%~4.12%之间,仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

序号	化合物名称	RSD% (2 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)	
		R.T.	Area	R.T.	Area
1	氨苯喋啶	0.07	2.93	0.10	1.97
2	丙磺舒	0.11	2.35	0.07	1.81
3	螺内酯	0.10	4.12	0.07	2.86
4	坎利酮	0.09	3.23	0.07	0.43
5	精磺胺	0.14	3.36	0.17	2.93
6	氯噻嗪	0.07	3.33	0.16	3.07
7	氢氯噻嗪	0.08	1.36	0.16	1.11
8	乙酰唑胺	0.07	2.41	0.15	1.62
9	氯噻酮	0.05	3.12	0.13	4.01
10	呋塞米	0.09	1.61	0.09	0.81

3.4 回收率

根据行业标准 SN/T5167-2019 中所明确的样品类型, 本实验选择其中一样品类型牛奶进行回收率实验。分别各取 6 份均为 2.00 g 的全脂牛奶样品, 分为两组, 每组中分别加入 10 μ L 和 20 μ L 的 1.0 mg/L 利尿剂混标溶液, 使溶液的理论定容浓度分别为 5 ng/mL 和 10 ng/mL, 按照 2.1 处理方法处理样品, 后上机测定。扣除牛奶本底值后再计算各化合物的平均回收率, 牛奶空白和牛奶前加标色谱图分别如下图 3-4。计算结果显示, 10 种利尿剂化合物的平均回收率在 64.82%~83.78% 之间, 回收率良好, 具体结果见表 5。

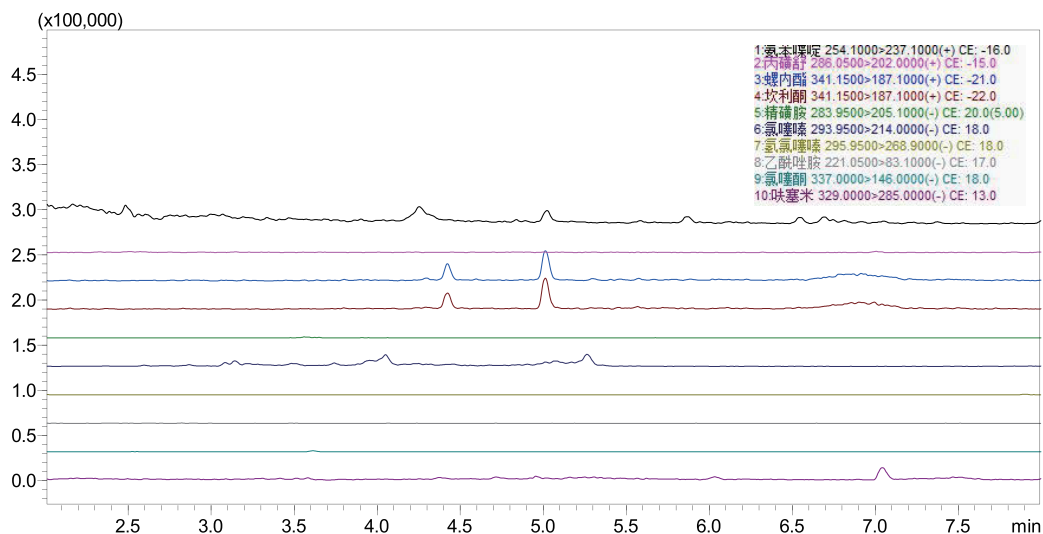


图 3 牛奶空白基质色谱图

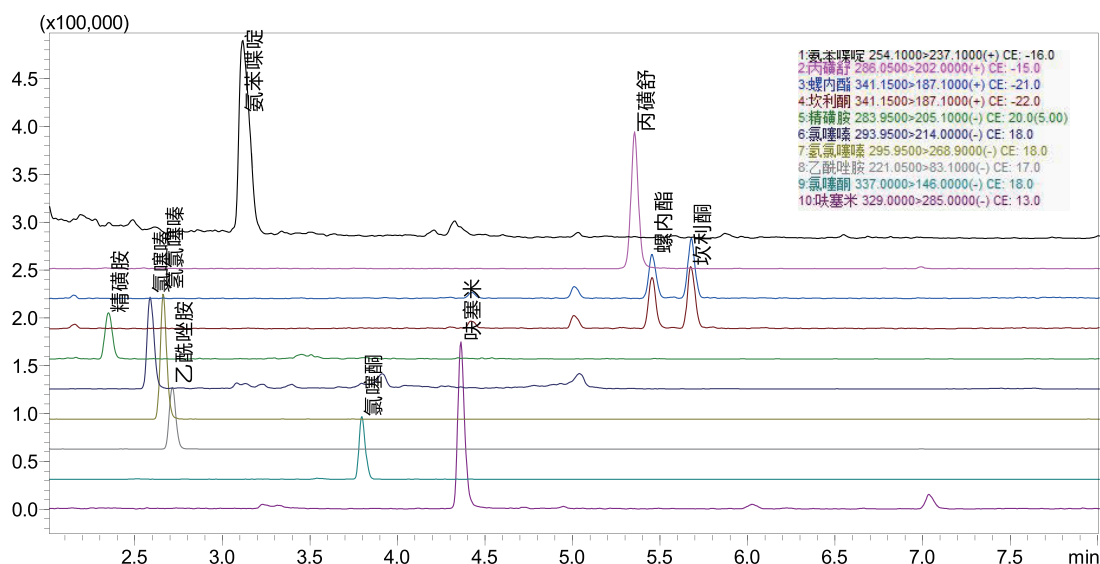


图4 牛奶空白基质前加标色谱图 (5.0 ng/mL)

表5 回收率测试结果 (n=3)

序号	化合物名称	平均加标回收率	
		加标浓度 (5 ng/mL)	加标浓度 (10 ng/mL)
1	氨苯喋啶	80.98	83.78
2	丙磺舒	70.76	72.52
3	螺内酯	70.28	73.46
4	坎利酮	64.82	67.73
5	精磺胺	66.12	71.56
6	氯噻唑	67.46	70.98
7	氢氯噻嗪	77.06	79.01
8	乙酰唑胺	67.36	71.38
9	氯噻酮	77.02	78.75
10	呋塞米	68.26	69.86

结论

本文参考检验检疫行业标准 SN/T 5167-2019, 建立使用岛津 LCMS-8050 在 11 min 内快速测定动物源食品中 10 种利尿剂残留的分析方法。该方法线性范围宽、重复性好、准确度高, 各化合物的仪器检出限 (ASTM 法) 在 0.06~0.32 ng/mL 之间, 完全满足标准中关于利尿剂的检测要求, 可以作为动物源食品中 10 种利尿剂残留量的监测方法。

岛津应用云

